

大豆组织培养的研究进展^{*}

王 萍 王 罡 吴 颖 季 静

(解放军军需大学植物分子生物学研究室, 长春 130062)

摘要 概述了大豆原生质体和单细胞的组织培养, 以及外植体经器官发生和体细胞胚胎发生途径再生植株的研究进展, 对不同再生途径进行了比较, 并指出了大豆组织培养存在的主要问题和今后研究方向。

关键词 大豆; 组织培养; 植株再生; 器官发生; 体细胞胚胎发生

中图分类号 S 565. 103. 53 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2003)02—0142—04

大豆的组织培养研究始于 20 世纪 60 年代, 但各种外植体的组织培养与再生植株都十分困难。直到进入 80 年代中、后期, 大豆的组织培养工作才有了突破性的进展。

大豆的组织培养除原生质体和单细胞培养外, 常用的外植体有真叶、下胚轴、子叶、子叶节、胚轴和胚等, 其诱导途径有两种: 一种是诱导外植体产生不定芽(或称丛生芽), 之后诱导芽形成根, 再形成完整植株, 即器官发生途径; 另一种途径是诱导体细胞胚胎发生, 胚萌发再生植株, 称胚胎发生途径。

1 大豆原生质体和单细胞的组织培养与植株再生

早在 60 年代, Cocking 用酶法成功地分离出高等植物原生质体后不久, 就有不少研究工作者试图用豆科植物进行原生质体的分离和培养。最早研究大豆原生质体培养的是 Kao 等和 Miller, 他们从悬浮细胞游离原生质体获得愈伤组织。在这以后近 20 年, 许多学者相继开展了大豆原生质体培养的研究, 从未成熟子叶、成熟子叶、叶和下胚轴分离出原生质体, 经培养获得愈伤组织, 个别见根的分化, 但未分化出植株。我国对大豆原生质体的游离与培养研究, 最早始于吉林省农业科学院大豆所的简玉瑜等^[1]。他们从大豆未成熟子叶游离出大量原生质体, 经培养保持分裂, 获得了肉眼可见的愈伤组织, 但也未获再生植株。最早大豆原生质体培养获再生植株研究成功的报道是中国上海植物生理研究所卫志明等^[2], 他们于 1988 年经器官发生途径获 87 株再生植株。中国科学家在大豆原生质体培养方面的

研究虽然起步较晚, 但研究进展快, 处于世界领先地位。随后, 美国 Dhir 等^[3,4]、南京农业大学吕慧能等^[5]也经此途径获再生植株。此外, 东北农业大学张贤泽等^[6]和中国农业科学院肖文言等^[7]经胚胎发生途径获大豆原生质体再生植株。

对大豆单细胞培养及植株再生的研究相对较少, Li 等^[8]以 TGM119 的未成熟子叶为材料, 分离单细胞在液体培养基中培养形成前胚体, 前胚被保存在固体培养基中 40 d, 产生的愈伤组织转到 MS 附加 0.2 mg/L BA 和 0.01 mg/L NAA 的培养基中, 在愈伤组织的表面形成球形和心形体细胞胚。进一步在液体培养基中培养 6 个月, 获得再生植株。1989 年吉林省农业科学院罗希明等^[9]将吉林 4、吉林 10、吉林 12、吉林 13、公交 7511、公交—751 和小青豆等 7 个大豆品种的 20 d 幼荚子叶接种于 MS 培养基上, 2 周继代 1 次, 40 d 形成大块愈伤组织, 将其分生能力强的部分转入 MS 液体培养基中, 振荡培养, 每隔 14 d 分别用 100 和 300 目尼龙网过滤, 得到大量悬浮培养的单细胞。每周继代 1 次, 经过 4 次继代后, 可见到小圆形细胞密集的分生区。这些愈伤组织可能为胚性愈伤组织, 待长大后转入 MS 分化培养基中, 继代 2 次的吉林 12 大豆分化出芽, 将芽转入无激素 MS 培养基上, 1 个月后长出发达的根系, 芽顶长出多片幼叶, 形成了完整的大豆植株。实验发现, 在单细胞培养中来源不同基因型大豆细胞的分化能力差别很大, MS 培养基较适合于大豆细胞培养, 单独使用玉米素诱导分化获得了再

^{*} 收稿日期: 2002—08—05

基金项目: 国家植物转基因中试及产业化基地专项基金(项目编号 J99—B—001)。

作者简介: 王 萍(1957—), 女, 博士, 教授, 研究方向作物遗传育种与植物基因工程。

生植株。愈伤组织在分化培养基上, 20 d 转移 1 次有利于分化, 下胚轴悬浮培养细胞愈伤组织难以分化出芽。尽管利用原生质体与单细胞培养直接导入外源基因是可靠且可重复的遗传转化方法, 但由于培养过程繁杂, 再生周期长, 在一定程度上限制了此研究在遗传转化上的应用。

2 大豆器官发生与植株再生

Kimball 等^[10] 1973 年以栽培大豆的下胚轴为材料在 B5 或 Miller 培养基附加 40 mg/L ADE+1 mg/L L-glutamine+0.1 mg/L 2,4,5-T 诱导产生芽, 但未获再生植株。大豆经器官发生再生植株最早的报道是 Kartha 等^[11], 外植体采用栽培大豆 (*G. max*) 的真叶。此后, 陆续出现一些经器官发生途径获得大豆再生植株的报道。Barwale 等^[12] 和周思君等^[13] 以未成熟胚为外植体, 陈云昭等^[14]、杨振棠等^[15]、Weight 等^[16] 和 Kim 等^[17] 以真叶为外植体, 吉林省农科院^[18]、杜娟等^[19]、Kaneda 等^[20]、程林梅等^[21] 和张晓娟等^[22] 以下胚轴为外植体, Mante 等^[23] 和 Junyi Gai 等^[24] 以成熟子叶为外植体, Tsai-Ying Cheng 等^[25]、刘德璞等^[26]、Yue-Sheng Yang 等^[27]、袁鹰等^[28] 和王萍等^[29] 以子叶节为外植体分别经器官发生途径获再生植株。

从以上的研究可知, 大豆由器官发生再生植株所用的外植体种类较多, 有真叶、下胚轴、子叶、子叶节和未成熟子叶等, 这些外植体在加有一定种类和浓度细胞分裂素的培养基上诱导培养后可产生芽, 并进一步再生植株。研究内容主要集中在基因型、培养基、激素和外植体种类等对芽形成的影响, 培养基以 MS 或 B5 基本培养基为多, 植物激素主要有 6BA、NAA、IBA 和 IAA 等。

3 大豆体细胞胚胎发生与植株再生

大豆体细胞胚胎发生是以大豆的体细胞组织为外植体诱导产生类似于合子胚的结构, 再进一步培养使其萌发产生再生植株。常用的外植体主要有大豆的未成熟子叶、未成熟胚和下胚轴等。

大豆体细胞胚胎发生的诱导最早的研究是 Beversdorf 等^[30] 1977 年以下胚轴、胚和子叶为外植体, 研究了基因型和培养基对体细胞胚胎发生诱导的影响, 他们以 B5、Miller、Blaydes 和 MS 为基本培养基, 附加 2,4-D 和 KT, 诱导出类似于胚的结构, 但未获体细胞胚。Gamborg 等^[31] 以 6 个大豆品种的下胚轴为材料, 以 SL 培养基附加 picloram 和 BA, 诱导出 2 个品种的胚胎发生。第一个真正的大豆经体细胞胚胎发生途径获再生植株的是 Christianson

等^[32] 的研究, 他们以未成熟胚的胚轴为材料, 用改良的 MS 培养基附加 2,4-D 诱导出体细胞胚胎的发生, 并获再生植株。Ranch 等^[33] 和 Lazzeri 等^[34] 分别以未成熟子叶、Barwale 等以未成熟胚为材料相继诱导体细胞胚胎发生, 成功地获得再生植株。随后, 许多国外研究者以未成熟胚或未成熟子叶为外植体在基因型、培养基、激素、蔗糖浓度、有机物、子叶大小、pH 值、光照、外植体切割方法、接种方式与接种量等方面进行了大量细致的研究 (Finer et al., 1988; Komatsuda et al., 1988、1990、1991、1992; Lazzeri et al., 1987、1988; Parrott et al., 1988; Hartweck et al., 1988; Christou et al., 1989; Sellars et al., 1991; Yue-Sheng Yang et al., 1990; Liu et al., 1992; Bailey et al., 1993; Nadolska-Orczyk et al., 1994; Tian et al., 1994; Liu et al., 1995; Santos et al., 1997; Samoylov et al., 1998)^[35-52], 但因试验材料与培养条件的不同, 试验结果不尽相同。

以未成熟子叶为外植体诱导大豆体细胞胚胎发生的研究国内仅有部分报道, 冯新华等^[53]、李大玮等^[54]、周思君等^[55-56]、薛仁镐等^[57]、刘博林等^[58]、刘艳芝等^[59]、邓向阳等^[60]、王昱等^[61]、王萍等^[62-64] 分别研究了大豆基因型、激素种类与浓度、接种方式、接种量和蔗糖对体细胞胚胎发生的影响, 认为大豆的未成熟子叶是较好的诱导体细胞胚胎发生的外植体, 在诱导体细胞胚胎发生时, 以 MS 基本培养基为首选, 附加高浓度的生长素 (2,4-D 或 NAA), 培养温度为 22-28℃。大豆在体细胞胚胎发生诱导过程中对光照的要求不很严格, 可以在黑暗条件下, 也可以进行光照 12-24h 处理, 光照强度的变化范围也较宽 (从 0.6-30 μ Em-2s-1 或 50-6000Lux)。

4 大豆组织培养的主要问题

大豆的组织培养与再生植株的研究经历了比其它农作物更加艰难的历程, 目前, 大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生途径与大豆成熟子叶节器官发生途径这两个体系基本建立起来, 这些工作为大豆转基因工作的开展奠定了良好的基础。但目前大豆组织培养的植株再生率还不很高, 以子叶节为外植体进行遗传转化得到的再生植株多为嵌合体, 利用大豆未成熟子叶诱导产生的体细胞胚胎发生这解决这一问题提供了可能途径, 但此体细胞胚不能继代增殖, 也在一定程度上影响了大豆遗传转化工作进行。如果大豆的体细胞胚能够经继代增殖, 将进一步推动大豆遗传转化研究进程。

参 考 文 献

- 1 简玉瑜. 大豆原生质体的游离、培养和愈伤组织的生成[J]. 大豆科学, 1983, 2(2): 101—103.
- 2 Wei Zhiming, Zhihong Xu. Plant regeneration from protoplasts soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1988, 7: 348—351.
- 3 Dhir Sawan K, Dhir Saeema, Savka Michael A, et al., Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts[J]. Plant Physiol., 1992, 99: 81—88.
- 4 Dhir Sarwan K, Dhir Seema, Widholm Jack M. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.); Genotypic differences in culture response[J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 285—289.
- 5 吕慧能, 盖钧铭, 马育华. 不同激素条件下大豆原生质体培养和植株再生[J]. 作物学报, 1993, 19(4): 328—333.
- 6 张贤泽, 小松田隆夫. 大豆原生质体经体细胞胚再生植株[J]. 中国科学(B辑), 1993, 23(2): 154—158.
- 7 肖文言, 王连铮. 大豆幼荚子叶原生质体培养及植株再生[J]. 作物学报, 1994, 20(6): 665—669.
- 8 Li BJ, Langridge WHR, Szaky AA. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean (*Glycine max*) [J]. Plant Cell Reports, 1985, 4: 344—347.
- 9 罗希明, 赵桂兰, 安利佳, 等. 大豆单细胞培养再生植株的研究[J]. 植物学报, 1989, 31(3): 231—234.
- 10 Kimball SL, Bingham ET. Adventitious bud development of soybean hypocotyl sections in culture[J]. Crop Science, 1973, 13: 758—760.
- 11 Kartha KK, Pahl K, Leung NL, et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean[J]. Can. J. Bot., 1981, 59: 1671—1679.
- 12 Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta, 1986, 167: 473—481.
- 13 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 从大豆幼胚诱导器官发生再生植株[J]. 大豆科学, 1990, 9(4): 285—291.
- 14 陈云昭, 王玉国. 大豆外植体培养再生植株的研究[J]. 山西农业大学学报, 1983, 3(1): 41—45.
- 15 杨振棠, 陈泽光, 刘志东, 等. 大豆叶片的离体培养及再生植株的诱导[J]. 科学通报, 1984, (16): 1012—1016.
- 16 Wright MS, Ward DV, Hinchey MA, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue[J]. Plant Cell Reports, 1987, 6: 83—89.
- 17 JooHag Kim, Clifford E. LaMotte et al. Hack. Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings[J]. J. Plant Physiol., 1990, 136: 664—669.
- 18 吉林省农业科学院作物育种所大豆组织培养组. 从大豆下胚轴愈伤组织诱导植株成功[J]. 植物学报, 1976, 18(3): 258—262.
- 19 杜娟, 田立国, 母秋华, 等. 大豆体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 吉林农业科学, 1995, 3: 13—14.
- 20 Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. Plant Cell Reports, 1997, 17: 8—12.
- 21 程林梅, 孙毅, 刘少翔, 等. 大豆不同外植体植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2): 21—24.
- 22 张晓娟, 方小平, 罗丽霞, 等. TDZ 和 BA 对诱导大豆胚轴植株再生的影响[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(1): 24—26.
- 23 Seth M ante, Ralph Scorza, John Cordts. A simple, rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of (*Glycine max*) cv Bragg [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1989, 25(4): 385—388.
- 24 Gai Jinyi, Guo Zibiao. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from germinated cotyledon of the soybean [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1997, 24(3): 41—44.
- 25 Tsai-Ying Cheng, Hitoshi Saka, Thanh H Voqui-dinh. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91—99.
- 26 刘德璞, 袁鹰, 菜豆 (*Phaseolus Vulgaris* L.), 大豆 (*Glycine max* L.) 组织培养绿苗分化及植株再生[J]. 吉林农业科学, 1989, (2): 79—81.
- 27 Yue-Sheng Yang, Kiyomi Wada, Yuzo Futsuhara. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants[J]. Plant Science, 1990, 72: 101—108.
- 28 袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1): 9—13.
- 29 王萍, 王军军, 商德虎, 等. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子研究[J]. 吉林农业科学, 2001, 26(6): 20—23.
- 30 Beversdorf WD, Bingham ET. Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species [J]. Crop Science, 1977, 17(3—4): 307—311.
- 31 Gamborg OL, Davis BP, Stahlhut RW. Somatic embryogenesis in cell cultures *Glycine* species [J]. Plant Cell Reports, 1983, 2: 209—212.
- 32 Christianson ML, Warnick DA, Carlson PS. A morphogenetically competent soybean suspension culture [J]. Science, 1983, 222: 632—634.
- 33 Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1985, 21(11): 653—658.
- 34 Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean [J]. Plant Mol. Biol. Rep, 1985, 3: 160—167.
- 35 Finer John J, Nagasawa Akitsu. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine Max* Merrill.) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1988, 15: 125—136.
- 36 Komatsuda T, Ohyama K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max* [J]. Theor Appl Genet, 1988, 75: 695—700.
- 37 Komatsuda Takao, Ko Su-Wan. Screening of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) genotypes for somatic embryo production from immature embryo [J]. Japan. J. Breed., 1990, 40(2): 249—251.
- 38 Komatsuda Takao, Kaneko Kazuhimko, Oka Seibi. Cell biology and molecular genetics Genotype× sucrose interactions for somatic em-

- bryogenesis in soybean[J]. Crop Sci., 1991, 31: 333—337.
- 39 Komatsude T, Lee Wenbin, Oka S. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracillis* Skvortz and [*Glycine max* (L.) Merr][J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 1992, 28: 103—113.
- 40 Lazzeri Paul A, Hildebrand David F, Collins Glenn B. Soybean somatic embryogenesis: Effect of hormones and culture manipulations [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 10: 197—208.
- 41 Lazzeri PA, Hildebrand DF, Sunega J, et al. Soybean somatic embryogenesis: interactions between sucrose and auxin[J]. Plant Cell Reports, 1988 7: 517—520.
- 42 Parrott WA, Dryden G, Vogt S, et al. Optimization of somatic embryogenesis embryo germination in soybean. In Vitro Cellular & Developmental[J]. Biology, 1988, 24(8): 817—820.
- 43 Hartweck LM, Lazzeri PA, Cui D, et al. Auxin—orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1988, 24(8): 821—828.
- 44 Christou Paul, Yang Ning—Sun (University Green, USA) Developmental aspects of soybean (*Glycine max*) somatic embryogenesis [J]. Annals of Botany, 1989, 64: 225—234.
- 45 Sellars Rebecca M, Sougheard GM, Phillips Gregory C. Cell biology and molecular genetics adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean[J]. Crop Sci., 1991, 30: 408—414.
- 46 Liu Wennuan, Moore Patricia J, Collins Glenn B. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol., 1992, 28P(7): 153—160.
- 47 Bailey MA, Boerma HR, Parrott WA. Genotype—specific optimization of plant regeneration from somatic embryos of soybean[J]. Plant Sci, 1993, 93: 117—120.
- 48 Anna Nadolska—Orczyk, Wacław Orczyk. New aspects of soybean somatic embryogenesis[J]. Euphytica, 1994, 80: 137—143.
- 49 Tian LN, Brown DCW, Voldeng H, et al. In vitro response and pedigree analysis for somatic embryogenesis of long—day photoperiod adapted soybean[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 36: 269—273.
- 50 Liu Wennuan, Hildebrand F, Collins Glenn B. Auxin—regulated changes of fatty acid content and composition in soybean zygotic embryo cotyledons[J]. Plant Science, 1995, 106: 31—42.
- 51 Santos KGB, Mundstock E, Bodanese—Zanettni MH. Genotype—specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16: 859—864.
- 52 Samoylov VM, Tucker DM, Thibaud—Nissen F, et al. A liquid—medium—based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 49—54.
- 53 冯新华, 蒋兴纛, 邵启全. 大豆[*Glycine max* (L.) Merr.] 未成熟子叶组织的体细胞胚胎诱导和植株再生的研究[J]. 中国科学(B 辑), 1988, 9: 939—943.
- 54 李大玮, J. Schmid, E. R. Keller. 大豆未成熟胚培养中高浓度植物生长素的作用及其植株再生[J]. 植物学报, 1989, 31(5): 349—354.
- 55 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39—45.
- 56 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 38—43.
- 57 薛仁镐, 刘淑兰, 韩碧文. 大豆未成熟子叶诱导胚状体发生再生植株[J]. 延边农学院学报, 1995, 17(3): 148—152.
- 58 刘博林, 徐民新. 两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生研究[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(2): 11—13.
- 59 刘艳芝, 赵桂兰, 刘莉, 等. 大豆幼胚子叶诱导胚胎发生[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(6): 16—18.
- 60 邓向阳, 卫志明, 许智宏. 大豆主栽品种体细胞胚胎发生的影响因素及再生植株[J]. 实验生物学报, 2000, 33(1): 69—79.
- 61 王罡, 王萍, 吴颖. 生长素诱导大豆未成熟子叶胚胎发生效应的研究[J]. 吉林农业科学, 2002, 27(2): 7—10.
- 62 王萍, 吴颖, 杨武杰, 等. 大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生及其相关因子的分析[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(1): 29—32.
- 63 王萍, 王罡, 吕文河, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因子的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(6): 606—609.
- 64 王萍, 卫居香, 李宜程, 等. 低温预处理对大豆未成熟子叶胚胎发生影响的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(3): 27—29.

CURRENT PROGRESS ON TISSUE CULTURE OF SOYBEAN

Wang Ping Wu Ying Wang Gang Ji Jing

(Laboratory of Plant Molecule Biology, Quartermaster University, Changchun 130062)

Abstract The current progress on tissue culture and plant regeneration of protoplast, sing cell, organogenesis and somatic embryogenesis was reviewed. Different pathways of inducing plant regeneration were compared. The main problems of tissue culture and researching direction of soybean in the future were also discussed.

Key words Soybean; Tissue culture; Plant regeneration; Organogenesis; Somatic embryogenesis